

Untersuchungen
zur oralen und intranasalen Immunisierung
gegen Pasteurellen bei Maus und Kalb

Edgar Waldner

1402



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554013_0071

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie
Infektions- und Seuchenmedizin
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. DDr. h.c. A. Mayr

Untersuchungen zur oralen und intranasalen Immunisierung
gegen Pasteurellen bei Maus und Kalb.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Edgar Waldner
aus
Teisendorf
München 1982

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. G. Terplan

Referent: Prof. Dr. DDr.h.c. A. Mayr

1. Korreferent: Prof. Dr. U. Lösch

2. Korreferent: Prof. Dr. E. Dahme



Tag der Promotion: 30. Juli 1982

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. <u>EINLEITUNG</u>	1
B. <u>SCHRIFTTUM</u> Lokale Immunisierung gegen Pasteurellen	2
1. <u>Orale Immunisierung</u>	2
1.1. <u>Lebendimpfstoffe</u>	2
1.2. <u>Impfstoffe aus inaktivierten Erregern</u>	6
2. <u>Nasale Immunisierung</u>	7
3. <u>Sonstige lokale Immunisierungsarten</u>	9
C. <u>EIGENE UNTERSUCHUNGEN</u>	11
1. <u>Material und Methoden</u>	11
1.1. <u>Versuchstiere</u>	11
1.2. <u>Herstellung der Impfstoffe</u>	11
1.2.1. <u>Bakterienstämme</u>	11
1.2.2. <u>Züchtung</u>	11
1.2.3. <u>Inaktivierung</u>	12
1.2.4. <u>Impfstoffzusammensetzung</u>	12
1.2.5. <u>Impfstoffapplikation und Impfdosis</u>	12
1.3. <u>Mäuseschutztest</u>	13
1.4. <u>Antikörperbestimmung</u>	14
1.5. <u>Feldversuche</u>	15
2. <u>Ergebnisse</u>	15
2.1. <u>Experimentelle Untersuchungen bei der Maus</u>	15
2.1.1. <u>Unschädlichkeitsuntersuchungen</u>	15
2.1.2. <u>Mäuseschutztest</u>	16

	Seite
2.1.3. <u>Antikörperbestimmung</u>	18
2.2. <u>Feldversuche</u>	19
D. <u>BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE</u>	21
E. <u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	25
<u>Summary</u>	26
F. <u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	27
<u>Lebenslauf</u>	

A. EINLEITUNG

Infektionen des Respirationstraktes sind eines der Hauptprobleme in der Kälbermast. Neben verschiedenen Virusarten spielen vor allem Pasteurellen als Infektionserreger eine wichtige Rolle. In der Vergangenheit wurde deshalb schon mehrmals versucht gegen Pasteurella-Infektionen mit Einfachimpfstoffen oder Kombinationsimpfstoffen (zusammen mit verschiedenen Viren) zu immunisieren. Alle bisher für das Kalb entwickelten Pasteurella-Impfstoffe haben sich aber in der Praxis nicht durchsetzen können. Die Frage nach einem wirksamen Impfstoff gegen Pasteurella-Infektionen beim Rind und Kalb ist heute, wegen der immer stärker werdenden Forderung der Öffentlichkeit auf weitgehenden Verzicht von Antibiotika in der Fleischproduktion, aktueller denn je.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Problem der aktiven Immunisierung gegen Pasteurellen neu aufgegriffen. Dazu wurde zunächst am Modell "Pasteurella multocida-Maus" untersucht, ob Unterschiede bezüglich Unschädlichkeit und Wirksamkeit zwischen den verschiedenen Applikationsarten subkutan, oral und intranasal bestehen. Im zweiten Teil wurde, aufbauend auf den Erfahrungen im Mäusemodell, die Wirksamkeit der Pasteurella-Impfung in Kälbermast- und Kälberaufzuchtbetrieben untersucht.

B. SCHRIFTTUM: Lokale Immunisierung gegen Pasteurellen

1. Orale Immunisierung

1.1. Lebendimpfstoffe

Lebendimpfstoffe zur oralen Immunisierung gegen *P. multocida*-Infektionen wurden bisher nur beim Geflügel (Huhn, Puten) eingesetzt. Die Untersuchungen wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen mit unterschiedlichen Impfstoffen vorangetrieben.

Bierer (5, 6, 7) impfte Truthühner mit einem nicht näher beschriebenen, avirulenten *P. multocida*-Stamm oral über das Trinkwasser. Dieser Impfstamm löste eine befriedigende Immunantwort aus, wenn er über 21 Tage dem Trinkwasser beigegeben wurde. Nach der Testinfektion starben in der Kontrollgruppe 71 %, dagegen nur 10 % in der Impfgruppe (5). Später beschrieben Bierer und Derieux die gleich gute Wirksamkeit, wenn der Impfstoff nur alle 2 Wochen (insgesamt 6-mal) dem Trinkwasser zugesetzt wurde. (6). Im Vergleich zu Impfstoffen aus inaktivierten Keimen, denen Öl bzw. Aluminiumhydroxid zugesetzt wurde, schnitt der oral zu verabreichende Lebendimpfstoff deutlich besser ab (7).

Die orale Immunisierung mit dem avirulenten *P. multocida*-Stamm hatte keinen negativen Einfluß auf die Größe und Entwicklung der Truthühner. Bei den im Laufe der Untersuchungen durchgeführten Laborpassagen verlor der Impfstamm aber seine immunisierenden Eigenschaften und konnte dadurch nie in Feldversuchen erprobt werden.

Ein anderer *P. multocida*-Impfstamm, dessen Verwendung zur oralen Immunisierung bei Truthühnern geprüft wurde, ist der "Clemson-University" (CU) - *Pasteurella multocida*-Stamm. Dieser Stamm geht auf einen virulenten Feldstamm zurück und wurde durch wöchentliche Passagen auf Blutplatten attenuiert. Trotz der Passage auf toten Nährböden

verlor der Impfstamm seine immunisierenden Eigenschaften nicht. Bei oraler Immunisierung von Truthühnern konnte sowohl eine belastbare Immunität gegen den virulenten Ausgangsstamm als auch gegen andere, heterologe *P. multocida*-Stämme nachgewiesen werden (8, 9, 10, 11, 12, 13).

Der CU-Stamm hat aber den Nachteil, daß er für Jungtiere noch eine Restvirulenz besitzt. Etwa 4,2 % der Truthühner starben nach Immunisierung mit dem CU-Stamm. Dieser Verlust durch den Lebendimpfstoff ließ sich auf 2,5 % senken, wenn die Küken vor der oralen Immunisierung mit einem Impfstoff aus inaktivierten Keimen immunisiert wurden. Für erwachsene Truthühner war der CU-Stamm bei der Trinkwasserimmunisierung unschädlich (8, 32).

Derieux wies bei Leghornhennen dagegen auch einen negativen Einfluß des CU-Stammes auf die Eiproduktion nach (35).

Der CU-Stamm hat aber den Vorteil, daß er innerhalb von größeren Tierpopulationen nicht von einem Tier auf das andere übertragen wird (10). Nach der Immunisierung mit dem CU-Stamm ließ sich sowohl eine lokale, als auch eine systemische Immunität nachweisen (5, 13, 24).

Die orale Immunisierung mit dem CU-Stamm muß möglichst früh erfolgen, da die Geflügelcholera beim Nutzgeflügel schon im Alter von 5-7 Wochen auftritt. Als günstigste Immunisierungstermine für einen belastbaren Schutz erwiesen sich für Hühner der 20. Lebenstag und für Truthühner der 35. Lebenstag. Wenn an diesen Tagen immunisiert wurde erstreckte sich der Schutz bis zur 12. Lebenswoche. Ab der 12. Lebenswoche war nur noch eine schwache Immunität ausgebildet (12).

Die für eine belastbare Immunität notwendige Impfdosis lag zwischen 10 und 20 Millionen Keimen des CU-Stammes. Bei Truthühnern war eine zweimalige Impfung im Abstand von 8 Stunden, bei Hühnern eine zweimalige Impfung im Abstand

von 3 Tagen am günstigsten (14, 19, 48).

Im Vergleich zu verschiedenen anderen Applikationsmethoden (lokal, nasal, konjunktival, subkutan) schnitt beim CU-Stamm die orale Immunisierung in bezug auf Wirksamkeit, Unschädlichkeit und Praktikabilität am besten ab. (11, 22, 47).

Über die Ergebnisse mit einem dritten avirulenten Impfstamm beim Geflügel berichten Maheswaren et al (38). Bei diesem Stamm handelt es sich um eine Temperaturmutante (M 2283) von einem virulenten *P.multocida*-Stamm. Der Stamm besitzt aber ebenfalls noch eine Restvirulenz und ist nur bei oraler Anwendung unschädlich. Bei intravenösen Injektionen an Truthühnern war der Stamm dagegen virulent und es traten auch Rückmutationen auf.

Die Schutzwirkung des Stammes konnte nur bei lokaler Testinfektion (intranasal) oder im Kontaktinfektionsmodell nachgewiesen werden. In diesen Versuchen ließ sich auch eine Kreuzimmunität gegen andere *P.multocida*-Stämme nachweisen. Die postvaccinale Immunität soll lokaler und weniger systemischer Natur sein. Im Trinkwasser überlebte der Stamm 46 Stunden. Als optimaler Immunisierungsrhythmus erwies sich die Impfung am 1., 8. und 15. Lebens- tag. Bezüglich der systemischen Immunität war die Wirksamkeit gleich gut, bezüglich der lokalen Immunität dagegen schlechter als bei CU-Stamm. (38).

Im Gegensatz zu dem gut wirksamen, aber nicht ganz unschädlichen CU-Stamm war der von Michael et al. (42) geprüfte attenuierte *P.multocida*-Impfstamm M-3-G genetisch stabil und absolut ungefährlich für Truthühner und Mäuse (38, 42, 43, 33, 49, 41). Insgesamt wurden mit diesem Stamm über 20 000 Truthühner und 11 600 Küken über das Trinkwasser immunisiert. Dabei wurden keinerlei Impfreaktionen beobachtet. Bei der Trinkwasserimmunisierung muß die Impfdosis so berechnet werden, daß jedes Tier mindestens 5×10^9 bis

5×10^{10} "cfu" (colony forming units) erhält. Der Impfstamm M-3-G ist in reinem Leitungswasser für eine Stunde und in Leitungswasser mit 5 % Magermilch für 4 Stunden stabil. In niederen pH-Bereichen werden die Impfkeime rasch inaktiviert. Eine Neutralisation des Gastrointestinaltraktes von Impflingen durch vorherige Verabreichung von verschiedenen Antacida brachte keine Verbesserung der Wirksamkeit und ermöglichte auch keine Senkung der Impfdosis (41).

Der M-3-G-Stamm wird nicht von einem Tier auf das andere übertragen. Deshalb muß jedes Tier die für einen Impfschutz notwendigen Keime aus dem Trinkwasser selbständig aufnehmen; man erreicht dies durch 2-stündigen Wasserentzug vor der Impfung. Das beste Immunisierungsergebnis wird nachgewiesen, wenn dreimal im Abstand von 7 bis 10 Tagen über das Trinkwasser immunisiert wird. Die erzielte postvaccinale Immunität ist nicht nur mit den homologen, sondern auch mit heterologen *P. multocida*-Stämmen belastbar (41).

In Vergleichsuntersuchungen mit dem M-3-G- und CU-Stamm hatte der M-3-G-Stamm mehr Vorteile. Neben der bereits angesprochenen absoluten Unschädlichkeit erwies sich der M-3-G-Stamm auch als wesentlich wirksamer bei der Impfung von Küken. Außerdem betrug die Immunitätsdauer nach dreimaliger Impfung mit dem CU-Stamm nur 6-8 Wochen, mit dem M-3-G-Stamm dagegen 8-bis 12 Wochen (42).

Alle bisher beschriebenen Impfstämme wurden durch Kulturpassagen attenuiert und besaßen keine Marker. Chengappa et al. entwickelten eine streptomycinabhängige (smd) Mutante von *P. multocida* Serotyp 3 (17, 43, 53). Erste Immunisierungsversuche an begrenzten Tierzahlen brachten folgende Ergebnisse: Der Stamm schützt Truthühner gegen eine künstliche homologe Infektion, wobei die Applikationsweise (oral, nasal, parenteral) keinen Einfluß auf die postvaccinale Immunität hatte. Der Impfstamm war absolut sicher, d.h. es wurden keine Impferkrankungen und keine Rückmutationen

zum virulenten Typ festgestellt. Die Verfasser empfehlen den smd-Stamm sowohl zur lokalen als auch zur parenteralen Impfung.

Alle Lebendimpfstoffe haben aber einen großen Nachteil. Da die P.multocida-Infektionen beim Geflügel relativ früh, nämlich in der 6. bis 8. Lebenswoche auftreten, müßte die Immunisierung schon im Bruthaus in der ersten Lebenswoche durchgeführt werden. Zu diesem Zeitpunkt wird allgemein Medizinalfutter mit verschiedenen Antibiotika gefüttert. Diese Antibiotika hemmen aber die Immunitätsentwicklung um ca. 35 bis 45 %. Nur eine Furazolidinosis in einer Konzentration von 0,011 % hemmte die Immunitätsentwicklung nach der Trinkwasserimpfung mit dem CU-Stamm nicht (20). Langzeitantibiotika wie Sulfonamide, Streptomycin in höherer Konzentration müssen 7 Tage vor der Impfung, wässrige Tetracyclinpräparate 3 Tage vor der Impfung abgesetzt werden (21, 23). Da der Impfstamm eine gewisse Verweilzeit im Körper benötigt um seine volle immunisierende Wirkung zu entfalten, dürfen Antibiotika erst wieder ab der 96. Stunde post vaccinationem an die Impflinge verfüttert werden.

Die gleichzeitige Verfütterung von Aflatoxine (sppm) und CU-Impfkeimen beeinflusste dagegen die Immunitätsentwicklung bei Truthühnern nicht (25).

1.2. Impfstoffe aus inaktivierten Erregern

Über die orale Immunisierung mit Impfstoffen aus inaktivierten Erregern liegen nur wenige Untersuchungen beim Geflügel vor. In vergleichenden Untersuchungen mit Lebendimpfstoffen schnitt der inaktivierte Impfstoff schlechter ab. Bierer (7) verglich die Wirksamkeit der Trinkwasserimmunisierung mit einem Lebendimpfstoff und einem inaktiviertem Impfstoff mit 5 P.multocida-Impfstoffen aus inaktivierten Keimen, die parenteral an Truthühnern verabreicht wurden. Das mit Abstand beste Ergebnis wurde mit dem Lebendimpfstoff erzielt.

Am schwächsten war die Immunität nach der Trinkwasserimpfung mit dem inaktivierten Impfstoff. Zwischen diesen beiden Impfstoffen lag das Ergebnis der parenteralen Immunisierung. Der Lebendimpfstoff schützte im Gegensatz zu den Impfstoffen aus inaktivierten Keimen nicht nur vor einer homologen, sondern auch vor einer heterologen Testinfektion. Verschiedene Inaktivierungsmethoden hatten keinen Einfluß auf die Immunogenität der *P.multocida* Keime. In diese Prüfung miteinbezogen wurden die Inaktivierung mit Hitze, Formalin, Betapropiolakton, Neomycin, Phenol, Sodium Acid und Thiomersal. Nur die Behandlung mit Glutaraldehyd zerstörte die immunisierenden Eigenschaften der *P.multocida*-Keime (30).

Über die erfolgreiche orale Immunisierung mit einem Impfstoff aus inaktivierten Keimen berichtete Heddleston und Rebers bei Küken. Die Wirksamkeit des Impfstoffes beschränkte sich auf homologe Stämme. Ein Vergleich mit einer Lebendvaccine wurde nicht durchgeführt (31).

2. Nasale Immunisierung

Über die nasale Immunisierung liegen bei weitem nicht so viele Ergebnisse vor wie über die orale Immunisierung. Bierer und Derieux (11) erprobten in einem Versuch auch die Wirksamkeit des *P.multocida*-CU-Stammes bei intranasaler Applikation. Sie tropften ca. $3,4 \times 10^7$ lebende, attenuierte Keime Truthühnern in die Nase. 14 Tage post vaccinationem ließ sich nach der Testinfektion keine belastbare Immunität nachweisen.

Positive Ergebnisse wurden dagegen mit der intranasalen Aerosolimpfung beschrieben (27, 50). Eine dreimalige Immunisierung mit einem Kombinationsimpfstoff aus inaktivierten *P.multocida*-Keimen und lebenden, attenuierten Newcastle Disease-Viren war unschädlich und schützte 75 % bis 100 % der geimpften Küken vor einer tödlichen *P.multocida*-Infektionsdosis. Die beiden Komponenten

P. multocida und Newcastle Disease-Virus beeinflussten sich weder bezüglich der Unschädlichkeit noch bezüglich der Wirksamkeit. Geimpfte Enten bildeten aber eine sehr viel bessere Immunität aus als Küken. Die Immunität nach der Aerosolimpfung war bei Küken nicht nur schwächer, sondern auch wesentlich kurzlebiger. Für die Stimulierung einer belastbaren Immunität gegen *P. multocida* mußten zwei- bis dreimal je $3,9 \times 10^9$ inaktivierte *P. multocida*-Keime via Aerosol appliziert werden. Die postvaccinale Immunität dauerte relativ kurz; so waren 30 Tage p.vacc. noch 90 % und 90 Tage p.vacc. nur noch 50 % der Tiere geschützt.

Für die Wirksamkeit der Pasteurella-Komponente blieb es gleichgültig, ob die Kombinationsvaccine:attenuierte ND-Viren oder attenuierte Hepatitisviren zusätzlich enthielt (51, 49).

Im Gegensatz zur oralen Immunisierung liegen auch bei anderen Tierarten begrenzte Erfahrungen mit der intranasalen Impfung gegen Pasteurellen vor (2, 54). Die Aerosolimpfung schützte Kaninchen besser als eine parenterale Impfung gegen *P. multocida*. Das beste Ergebnis wurde erreicht, wenn zuerst dreimal mit formalininaktivierten Keimen grundimmunisiert und dann mit lebenden, attenuierten Keimen via Aerosol revacciniert wurde. Die alleinige Impfung mit inaktivierten Keimen stimulierte nur eine lokale Immunität, während nach dem Booster mit lebenden Keimen, sowohl eine lokale, als auch eine systemische Immunität nachgewiesen werden konnte.

Bei Kälbern wurde die Aerosolimpfung mit einem Kombinationsimpfstoff aus Parainfluenza 3-Viren und Pasteurella haemolytica Keimen (formalininaktiviert) untersucht. Die Impfung erfolgte an 3 Tagen (3., 7. und 11.Tag) mit jeweils ca. 10^{10} inaktivierten Erregern. Der Schutz gegen Über einer Testinfektion mit virulenten *P. haemolytica*-Keimen blieb unbefriedigend. Auch die Kombination mit der parenteralen Impfung brachte keine Wirksamkeitssteigerung. Interessanter-

weise war sogar die kombinierte Aerosol- und Parenteralimpfung noch weniger erfolgreich als bei Trennung der beiden Applikationsarten. Verbessern ließ sich das Immunisierungsergebnis, wenn dreimal an einem Tag, ca 30 Minuten lang, via Aerosol geimpft wird (28, 34, 37).

3. Sonstige lokale Immunisierungsarten

Alle anderen lokalen Immunisierungsarten wurden vor allem in Vergleichsuntersuchungen mit der oralen oder nasalen Impfung beim Geflügel mitgeprüft und konnten schon allein wegen der relativ komplizierten Applikationsweise wenig Bedeutung in der Praxis erlangen. Untersucht wurden auf diese Weise die tracheale, lokale und okulare Impfung, sowie die Impfung über die Gaumenspalte.

Die avirulente Mutante M-2283 von *P.multocida* (Serotyp 4) erzeugte bei trachealer Applikation eine starke lokale Immunität, sowohl gegen homologe als auch gegen heterologe *P.multocida*-Stämme (36). Die lokale postvaccinale Immunität wurde an verschiedenen Infektionsmodellen nachgewiesen.

Bei der kloakalen Impfung von Küken wurde ein mit ca. 250×10^6 *P.multocida* Keimen des CU-Stammes getränkter Baumwolltupfer die Kloake eingeführt. Es konnte aber zu keinem Zeitpunkt post vaccinationem eine Immunität nachgewiesen werden (11).

Positive Ergebnisse wurden von der okularen Immunisierung nur dann beschrieben, wenn der Impfstoff, in dem Fall ca 34 Millionen Keime des CU-Stammes, in den Konjunktivalsack getropft wurde (11). Küken, denen 70×10^6 attenuierte Erreger auf das Auge aufgeträufelt wurden, bildeten dagegen keine Immunität aus (46).

Für die Impfung über die Gaumenspalte wird, wie bei der kloakalen Impfung, ein Baumwolltupfer mit ca. 250×10^6 Keimen des CU-Stammes getränkt und für kurze Zeit in die

Gaumenspalte verbracht. In der Gaumenspalte werden die Erreger vom Tupper abgestreift. Auf diese Weise geimpfte Truthühner waren 14 Tage später gegen eine Testinfektion geschützt. Die Immunität war aber schwächer als zum Beispiel nach oraler Impfung über das Trinkwasser (11, 22, 48, 47).

Bei Küken wurde dagegen das umgekehrte Ergebnis erzielt (22). Während die Trinkwasserimmunisierung mit dem CU relativ unbefriedigende Ergebnisse brachte, stimulierte die Impfung über die Gaumenspalte ein befriedigendes Impfergebnis. Das Ergebnis hängt aber sehr stark von der Applikationstechnik ab. Auch wegen des großen Risikos, bei der Impfung Schleimhautverletzungen zu setzen, wird sich diese Impfmethode in der Praxis nicht durchsetzen.

Beim Kaninchen wirkte eine tracheale Immunisierung mit phenolinaktivierten *P.multocida*-Keimen ebenso gut, wie die subkutane oder intraperitoneale Impfung (36).

Tab. 1: Überblick über die verschiedenen *P. multocida* Lebendimpfstoffe beim Geflügel

<i>P. multocida</i> - Impfstamm	Impfdosis	Applikation	Anwendungs- gebiet	Immunität	Autoren
Bierer 68 (nicht näher beschr. atten. Feldstamm)	nicht bekannt	oral, über Trinkwasser 24 Tg tgl. 6x alle 14 Tg	Truthühner	heterolog + homolog	5, 6, 7, 48
smd- (strepto- mycinabhängige) Mutante	10^9 Keime	oral, nasal, parenteral	Truthühner	lokal (homolog und heterolog)	
M 2283 Temperatur- Mutante	19×10^6 ($1,2-17 \times 10^6$) 10^6	oral 40-90 % Trinkwasser tracheal 100 % 1.-8.-15. Tag	Truthühner	lokal u. systemisch heterolog und homolog,	38
M-3-G (atten. Feldst.)	5×10^9 - 5×10^{10} cfu	oral, Trinkwasser 3x7-10 Abstand	Truthühner (Mäuse) Küken	homolog und heterolog, hält 8-12 Wo.	33, 41, 42
CU-Stamm (atten. durch Kulturpassagen)	10×10^6 - 20×10^6 250×10^6 $3,4 \times 10^6$ 250×10^6	oral, Trinkwasser 3x nasal Okularsack Gaumenspalte	Truthühner Küken Truthühner Truthühner Küken	lokal u. systemisch heterolog und homolog, hält 6-8 Wo. oral oral	8, 9, 10, 11, 12, 13 46, 14, 19, 47, 48 22
	$3,4 \times 10^7$ 250×10^6 70×10^6	intranasal cloacal, aufs Auge getropft		neg. neg. neg.	11, 22

C. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

1. Material und Methoden

1.1. Versuchstiere

Es wurden konventionell in Makrolonkäfigen gehaltene, weibliche NMRI-Mäuse mit einem Gewicht von 20 g bis 35 g bei Versuchsbeginn verwendet. Futter und Trinkwasser standen ad libitum zur Verfügung. Bei den über das Trinkwasser geimpften Mäusen wurde für die Dauer der Vaccineapplikation die angebotene Wassermenge auf den Tagesbedarf der Tiere abgestimmt und alle 24 Stunden erneuert.

1.2. Herstellung der Impfstoffe

1.2.1. Bakterienstämme

Zur Impfstoffherstellung wurden folgende *P.multocida*-Stämme verwendet: Serotyp 7:A, 6:B, 6:D und 6:E.

Neben diesen 4 Referenzstämmen von *P.multocida* diente auch ein in der bakteriologischen Diagnostik unseres Instituts aus dem Nasenschleim eines an enzootischer Bronchopneumonie erkrankten Jungrindes isolierter *P.haemolytica*-Stamm zur Vaccinherstellung.

1.2.2. Züchtung

Zur Produktion der notwendigen Keimmenge wurden die Pasteurellen in einem Fermenter angezüchtet. Als Nährmedium diente ein *Pasteurella*-Medium das nach Bain in der Modifikation von Cameron und Smit hergestellt wurde (1, 15). Die Beimpfung erfolgte mit der Abschwemmung einer 18-stündigen Plattenkultur (pro Liter ca. 10^6 Keime). Die Bebrütungszeit im Fermenter betrug 18 bis 20 Stunden bei einer Temperatur von 37°C . In dieser Zeit wurde das Medium ständig begast (1000 ccm/min. Luft) und gerührt

(200 Rpm). Anschließend wurde die Fermenterkultur 1 Stunde bei 2800 UpM (4°C) zentrifugiert und der Bodensatz dann als Antigen für die Impfstoffherstellung verwendet.

1.2.3. Inaktivierung

Die Inaktivierung der *P.multocida*-Keime erfolgte in einem geschlossenen Durchlaufsystem durch Kurzzeiterhitzung auf 100°C über etwa 3 Minuten. Nach Prüfung der Sterilität mit den üblichen kulturellen Methoden wurde die inaktivierte Pasteurellensuspension ohne weitere Behandlung verwendet. Die Einstellung der Dichte erfolgte mit physiologischer Kochsalzlösung.

1.2.4. Impfstoffe

Insgesamt verwendeten wir 2 unterschiedliche Impfstoffe:

- A) Experimentelle Vaccine für Mäuseschutztest: Diese monovalente Vaccine wurde mit dem *P.multocida*-Stamm 7:A hergestellt.
- B) Polyvalente Vaccine: Sie setzte sich aus den Antigenen der *P.multocida* Stämmen 7:A, 6:B, 6:D und 6:E sowie einem aus der Praxis isolierten *P.haemolytica* Stamm zusammen.

1.2.5. Applikation und Impfdosis

Die Applikation der Impfstoffe erfolgte bei der Maus subkutan, oral und intranasal. Die zweimalige subkutane Injektion von $1,25 \times 10^{10}$ *P.multocida* Keimen erfolgte am Rücken. Bei der oralen Impfung wurde der Impfstoff an 10 aufeinanderfolgenden Tagen über das Trinkwasser verabreicht, wobei jede Maus täglich $1,25 \times 10^{10}$ inaktivierte Keime erhielt. Zur intranasalen Applikation wurden 0,125 bzw. 0,06 ml Impfstoff den Mäusen im Ätherrausch auf die Nasenöffnungen aufgetropft. Die applizierte Gesamtkeimmenge lag pro Tier bei $6,25 \times 10^9$ inaktivierten Keimen.

Beim Kalb wurde die Impfung oral und intranasal durchgeführt. Für die orale Impfung wurde der Impfstoff täglich einmal über die ersten 10 Lebenstage oral, in 1/2 bis 1 Liter Austauschmilch verdünnt, verabreicht. Bei der intranasalen Impfung wurde der Impfstoff mit einem Sprayadapter in einer Menge von 0,5 ml in der Nase versprüht. Die einmalige orale Dosis lag bei 10^{11} , die intranasale Dosis bei 1×10^{10} inaktivierten Keimen pro Stamm.

1.3. Mäuseschutztest

Für die Herstellung der Challengesuspension wurden Blutagarplatten mit lyophilisierten Standardmaterial des *P.multocida*-Stammes 7:A beimpft, 12 Stunden bei 37°C bebrütet und mit physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt. Zur Belastung dienen verschiedene Verdünnungsstufen (in Potenzen zur Basis 10). Die Ausgangskeimzahl betrug etwa 5×10^{10} virulente Keime pro ml.

Zwei Wochen nach der letzten Impfstoffapplikation erhielten die Impflinge und gleichzeitig die unter den gleichen Bedingungen gehaltenen Kontrolltiere jeweils 0,25 ml von den verschiedenen Verdünnungen (abgestuft in Potenzen zur Basis 10) der *P.multocida*-Belastungssuspension intraperitoneal injiziert. Pro Verdünnungsstufe wurden 8 bis 10 Mäuse verwendet.

Aus der Mortalität der Versuchstiere innerhalb von 10 Tagen wurde die LD_{50} der Belastungssuspension sowohl für die Kontrolltiere als auch für die Impflinge nach der Methode von Spearman-Kärber berechnet. Der Unterschied zwischen den Logarithmen (Basis 10) der LD_{50} bei den Impflingen und bei den Kontrolltieren diente als Maßstab für die Wirksamkeit des jeweiligen Impfstoffes und wurde als Schutzwert bezeichnet. Nach Ose und Muenster besitzt ein Impfstoff eine ausreichende Wirksamkeit, wenn sein Schutzwert mindestens 2 beträgt. (44).

1.4. Antikörperbestimmung

Mit dem enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) wurden die Antikörper in den Mäusesera bestimmt. Als Ausgangsmaterial für die Antigenherstellung zur Plattenbeschichtung diente eine Abschwemmung einer dicht mit *P. multocida*-Keimen bewachsenen Blutplatte. Die Abschwemmung wurde 30 Minuten bei 3000 UpM zentrifugiert. Anschließend wurden 10 ml des gekühlten (2°C) Bodensatzes mit 16 ml 75 %iger Phenol-Wasser-Mischung (5°C) gemischt. Nach 20 minütiger Einwirkungszeit bei 5°C wurde das Gemisch 30 Minuten bei 35 000 g zentrifugiert und die wässrige Phase anschließend 2 Tage lang gegen fließendes Leitungswasser dialysiert. Nach einer weiteren 1 tägigen Dialyse gegen Aqua dest. und Einstellen des pH auf 7,2 mit 1 %iger KOH erfolgte die Beschichtung der Flachbodenplatten (M129A, Flow Laboratories, Borm) mit 0,1 ml der Antigenverdünnung (1:100 in Karbonat/Bikarbonat-Puffer pH 9,6) pro Vertiefung. Die Platten wurden anschließend mit Tesafilm verschlossen, 3 Stunden bei 37°C inkubiert und bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Nach dreimaligem Waschen der Platten mit NaCl-Phosphatpuffer plus Tween (8 g NaCl + 0,2 g KH_2PO_4 + 2,9 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$ + 0,2 g KCl pro 1 l Aqua dest. + 0,05 % Tween 20) beschichten wir die Vertiefung mit je 0,1 ml der in 2er Stufen mit NaCl-Phosphat plus Tween verdünnten Sera. Nach 1 stündiger Bebrütung bei 37°C wuschen wir die Platten viermal und füllten je 0,1 ml des 1:1000 in NaCl-Phosphat mit 5 % FKS ohne Tween verdünnten Peroxidase-Anti-Mouse-Konjugates (Fa. Miles Yeda LTD) ein. Nach erneuter einstündiger Bebrütung bei 37°C und viermaligem Waschen, erfolgte die Zugabe von je 0,1 ml Substrat (0,5 g p-Phenyldiamin der Fa. Sigma, München + 4,67 g Zitronensäure + 9,15 g Na_2HPO_4 pro 1 l Aqua dest, kurz vor Gebrauch Zugabe von H_2O_2 auf eine Verdünnung von 1:6000). Die Platten wurden etwa 10 Minuten im Mikro-Shaker von Dynatek geschüttelt und bis zur Ablesung bei 510 nm im Multiscan, Photometer (Flow Laboratories, Bonn) eine Stunde bei Zimmertemperatur inkubiert.

1.5. Feldversuch

Die erfaßten Daten beziehen sich auf Impfungen von 209 Kälbern in 3 Betrieben (158 Kontrolltiere wurden zusätzlich beobachtet) im Winter 1981/82 in Bayern. Alle Erhebungen wurden an Hand eines Fragebogens durchgeführt, der von den Tierbesitzern für jedes Tier gesondert auszufüllen war. Die wichtigsten Daten des Erhebungsbogens betrafen: Art der Haltung, Stallhygiene, klinische Situation vor, während und nach der Schluckimpfung, Behandlung Erkrankungsfälle wurden klinisch und bakteriologisch untersucht.

Das Krankheitsbild wurde eingeteilt in Tiere mit und ohne respiratorischen Erkrankungen. Als respiratorische Erkrankungen galten seröser bis eitriger Nasenausfluß und gestörtes Allgemeinbefinden mit Fieber. Alle Erkrankungsfälle im Beobachtungszeitraum wurden bakteriologisch untersucht.

2. Ergebnisse

2.1. Experimentelle Untersuchungen bei der Maus

2.1.1. Unschädlichkeitsuntersuchungen

Insgesamt wurden 120 Mäuse oral mit einer P.multocida-Vaccine (Stamm 7:A) auf der Basis hitzeinaktivierter Keime geimpft. Bei keinem Tier kam es während eines Beobachtungszeitraumes von 14 Tagen zu Störungen des Allgemeinbefindens bzw. sonstigen postvaccinalen Reaktionen.

Nach nasaler Applikation der P.multocida-Vaccine (Stamm 7:A) starben in den Vorversuchen innerhalb der ersten 2 Tage p.vacc. etwa 50% der Impflinge. In den weiteren Untersuchungen stellten wir fest, daß das zunächst für die intranasale Impfung gewählte Impfvolumen von 0,125 ml für die Maus zu groß war. Nach Senkung des Impfvolumens auf 0,06 ml war der P.multocida-Impfstoff aus hitzeinaktivierten

Keimen bei nasaler Applikation absolut unschädlich.

Bei subkutaner Verabreichung des Impfstoffes entstanden gelegentlich geringe lokale Reaktionen an der Impfstelle, das Allgemeinbefinden der Tiere war aber nicht beeinträchtigt.

2.2.2. Mäuseschutztest

Die Wirksamkeit der oralen und intranasalen Immunisierung im Vergleich zur subkutanen Impfung gegen *P.multocida* prüften wir in 3 getrennten Versuchsreihen. Bei diesen Versuchen verwendeten wir zur Immunisierung einen "wärmeinaktivierten" Impfstoff (2 Min. 98°C) vom Stamm 7:A und für den Challenge den *P.multocida*-Stamm (Serotyp 7:A). Die Ergebnisse der 3 Versuchsreihen (I, II und III) sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. Die Applikation des Pasteurella-Impfstoffes erfolgte in Versuch I oral und subkutan, in Versuch II nur oral und in Versuch III oral, intranasal und subkutan.

Nach zehnmaliger, oraler Vaccination über das Trinkwasser errechneten wir Schutzwerte von 4,3 im Versuch I, 2,1 in Versuch II und 2,9 in Versuch III. Damit lagen in jedem Versuch die Schutzwerte über dem von Ose und Muenster für die Zulassung einer Pasteurella multocida-Vaccine geforderten Mindestschutzwert von 2,0 (44). Auffallend war die relativ große Schwankungsbreite zwischen den Ergebnissen der einzelnen Versuche. Auch in der Dosis-Wirkungskurve traten, vor allem in den niedrigen Belastungsbereichen, Abweichungen auf. So starben noch Tiere bei Belastungsdosen, bei denen eigentlich nach dem Kurvenverlauf keine Todesfälle mehr zu erwarten gewesen wären. Diese starken Schwankungen weisen darauf hin, daß nach Trinkwasserimpfung bezüglich Impfstoffaufnahme individuelle Unterschiede bestehen.

Ein wesentlich günstigeres Immunisierungsergebnis als mit der oralen Impfung erreichten wir mit der einmaligen intra-

nasalen Impfung (Versuch III). Obwohl nur ca. ein Zehntel der subkutanen Dosis bzw. ca. ein Vierzigstel der oralen Dosis verimpft wurde, lag der Schutzwert im Versuch III mit 4,8 nur um 1,3 unter dem bei subkutaner Applikation aber noch um 0,9 über dem bei oraler Impfung über das Trinkwasser.

Nach subkutaner Applikation konnten die höchsten Schutzwerte erzielt werden, nämlich im Versuch I mit 4,9 und im Versuch II mit 6,0. Der Unterschied von 1,1 zwischen den beiden Versuchen liegt noch im Toleranzbereich.

In den ersten Mäuseversuchen wurde mit einer monovalenten P.multocida-Vaccine (Stamm 7:A) immunisiert. In der Praxis kommen aber mehrere Serotypen von P.multocida beim Rind vor. Die verschiedenen Serotypen unterscheiden sich in 4 Kapselantigenen (A, B, D, E) und 12 somatischen Antigenen (1-12). Für die Herstellung einer polyvalenten Vaccine gegen P.multocida war nun wichtig zu wissen, welches Antigen für die Immunität verantwortlich ist und ob Kreuzimmunitäten zwischen O- und K-Antigenen ausgebildet werden. Um diese Fragen zu klären impften wir verschiedene Tiergruppen subkutan mit den verschiedenen monovalenten P.multocida-Impfstoffen, die zum Teil die gleichen O- oder K-Antigene besaßen. 4 Wochen p.vacc. wurden die Tiergruppen mit den homologen und heterologen P.multocida-Stämmen intraperitoneal belastet. Die Ergebnisse post infectionem sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.

Wie aus der Tabelle ersichtlich wird, war die Wirksamkeit der 4 monovalenten P.multocida-Impfstoffe bei homologer Belastung gleich. Im niederen Belastungsbereich (1 oder 2 LD₅₀) überlebten alle Impflinge, während bei den Kontrolltieren die Mortalität zwischen 80 und 100 % betrug. Nach homologer Belastung mit 10 LD₅₀ lagen die Mortalitätsraten für die Impflinge zwischen 0 und 20 %, für die Kontrolltiere dagegen bei 100 %.

Die Ergebnisse der heterologen Belastungen sind in zweierlei Hinsicht interessant. Obwohl drei der 4 Vaccinen dasselbe O-Antigen 6 aufwiesen, war zwischen diesen Impfstoffen praktisch keine Kreuzimmunität nachzuweisen. Da sich diese Impfstoffe aber in den Kapselantigenen unterscheiden, kann man davon ausgehen, daß in unserer Vaccine das Kapselantigen Träger der Wirksamkeit ist.

Interessanterweise schützten aber die 3 Impfstoffe 6:B, 6:D und 6:E Mäuse teilweise gegen eine heterologe Belastung mit dem Stamm 7:A. Die Kreuzimmunität erreichte aber nie die Qualität der Immunität nach homologer Belastung.

2.2.3. Antikörperbestimmung

Die Wirksamkeit der lokalen Immunisierung im Vergleich zur subkutanen wurde auch durch die Bestimmung postvaccinaler Antikörper mit dem ELISA untersucht. Für diese Versuche wurden Mäuse entweder zehnmal oral, einmal intranasal oder zweimal subkutan mit hitzeinaktivierten *P.multocida*-Keimen (Stamm 7:A) geimpft. Die Impfdosis für die orale Impfung betrug $1,25 \times 10^{11}$ inaktivierte Keime. Die Ergebnisse der Antikörperbestimmung vor und 14 Tage nach der Impfung sind in Tabelle 4 zusammengestellt. Zum Vergleich wurden die Schutzwerte aus den Belastungsversuchen mitaufgeführt.

Die humoralen, postvaccinalen Antikörpertiter korrelieren gut mit den Schutzwerten. Den höchsten Antikörpertiter (1:320) maßen wir bei den zweimal subkutan geimpften Mäusen. Die Gruppe hatte auch den höchsten Schutzwert im Mäuseschutztest. Die Antikörpertiter nach nasaler Impfung lagen je nach Impfdosis bei 1:80 bzw. 1:160, obwohl intranasal nur einmal und mit einer 50- bzw. 500-fach niedrigeren Dosis im Vergleich zur subkutanen Impfung immunisiert wurde. Die orale Impfung stimulierte erwartungsgemäß den niedrigsten Antikörpertiter von 1:60. Dies kommt auch in dem etwas niedrigeren Schutzwert von 3,8 zum Ausdruck.

Tab. 2: Schutzwerte nach oraler, intranasaler und subkutaner
Impfung von Mäusen mit einer Pasteurellenvaccine¹⁾
auf der Basis hitzeinaktivierter Erreger.

		Applikations- art des Impfstoffes	Zahl der Impf- ungen	LD ₅₀ der Pasteurellen- Belastungs- suspension	Schutz- wert
Ver- such I	Geimpfte Tiere	oral	zehn- mal	10 ²	4,3
		subkutan	zwei- mal	10 ^{1,4}	4,9
	Kontroll- tiere			10 ^{6,3}	
Ver- such II	Geimpfte Tiere	oral	zehn- mal	10 ^{3,3}	2,1
	Kontroll- tiere			10 ^{5,4}	
Ver- such III	Geimpfte Tiere	oral	zehn- mal	10 ^{3,4}	2,9
		intranasal	ein- mal	10 ^{1,5}	4,8
		subkutan	zwei- mal	10 ^{0,3}	6
	Kontroll- tiere			10 ^{6,3}	

1) hergestellt von P.multocida-Stamm 7:A

2) pro Verdünnungsstufe 10 bis 8 Tiere

Tab. 3: Ergebnis der Kreuzimmunisierungsversuche mit 4 verschiedenen P.multocida-Stämmen im Mäuseschutztest

Impf- stamm ¹⁾	Ergebnis n. Belastungsinfektion ²⁾ (Letalität)									
	7:A		6:B		6:D		6:E			
	10 LD ₅₀	1 LD ₅₀	20 LD ₅₀	2 LD ₅₀	10 LD ₅₀	1 LD ₅₀	20 LD ₅₀	100 %	2 LD ₅₀	80 %
7:A	0	0	100 %	80 %	70 %	50 %	100 %	70 %	80 %	70 %
6:B	20 %	0	20 %	0	20 %	50 %	70 %	100 %	30 %	0
6:D	50 %	20 %	100 %	100 %	0	0	100 %	100 %	100 %	70 %
6:E	30 %	0	100 %	70 %	100 %	20 %	100 %	100 %	100 %	70 %
Kontrolltiere	100 %	50 %	100 %	80 %	100 %	50 %	100 %	100 %	100 %	70 %

1) einmalige subkutane Impfung m. 10^{10} hitzeinaktivierten (3 min., 100°C) P.-Keimen

2) n = 10 pro Gruppe

Tab. 4: Ergebnis der Serumantikörperbestimmung (ELISA) bei Mäusen, die oral, nasal und subkutan mit hitzeinaktivierten P.mutocida-Keimen immunisiert wurden.

Immunisierungsart	Impfdosis (Zahl d. inaktivierten Keime)	Zahl d. Impfungen	Antitoxintiter ¹⁾		Schutzwert vgl. Tab. 2)
			vor der Impfung	3 Wochen p.vacc.	
oral Trinkwasser	$1,25 \times 10^{11}$	10	neg.	1:60	3,8
intranasal	3×10^9	1	neg.	1:80	4,8
	3×10^8	1	neg.	1:160	5,4
subkutan	$1,25 \times 10^{10}$	2	neg.	1:320	6

1) pro Gruppe wurde ein Serumpool von 10 Tieren untersucht

2.2. Feldversuche

In Betrieben, in denen gehäuft respiratorische Erkrankungen während der Aufzucht oder Mast auftraten, wurde die Wirksamkeit einer polyvalenten Pasteurella-Vaccine, die hitzeinaktivierte Keime von 4 verschiedenen *P. multocida*-Stämmen und einem *P. haemolytica*-Stamm enthielt, getestet. Die Anwendung des Impfstoffes erfolgte entweder oral oder intranasal. Die Impfdosis für die zehnmalige, orale Impfung betrug ca 10^{12} und für die intranasale Impfung ca. 10^{10} inaktivierte Keime pro Stamm.

Das Ergebnis der oralen Immunisierung in Aufzuchtbetrieb A. ist in Abbildung 11 zusammengestellt. In diesem Bestand wurden in einem Zeitraum von 7 Monaten insgesamt 61 Kälber einmal täglich an den ersten 10 Lebenstagen oral immunisiert. Beim Vergleich der Ergebnisse aus der klinischen Untersuchung bei der Impfgruppe mit den Ergebnissen aus der Kontrollgruppe vor und nach der Impfperiode ergab sich folgendes Bild. In dem Zeitraum vor der Impfung zeigten von 48 Kälbern 16,6 % in den ersten 3 Lebenswochen respiratorische Symptome, die sich in Nasenausfluß, Fieberanstieg mit zeitweiliger Inappetenz äußerten. Von den Impflingen erkrankten dagegen nur 6,6 % an respiratorischen Symptomen. Nach Absetzen der oralen Immunisierung traten sofort wieder vermehrt Erkrankungsfälle auf und zwar bei 25 % der 52, von Februar bis März geborenen Kontrollkälbern. Bei fast allen erkrankten Kälbern konnten *P. haemolytica*-Keime aus dem Nasensekret isoliert werden.

Die Wirksamkeit der oralen Immunisierung wurde auch in einem Kälbermastbetrieb (Bestand H.) unter Praxisbedingungen geprüft. Dazu wurden von 40 Tieren in einer geschlossenen Stalleinheit 20 Kälber oral immunisiert und 20 nicht immunisiert. Die Impfung erfolgte über die Austauschmilch und zwar einmal täglich an den ersten 10 Tagen nach der Aufstellung. In dem Beobachtungszeitraum von 4 Wochen post vaccinationem erkrankten 12 der 20 geimpften und 16 der

20 nicht geimpften Kälber mit respiratorischen Symptomen. Bei allen erkrankten Kälbern ließen sich *P. multocida*-Keime aus dem Nasensekret isolieren.

Im selben Mastbetrieb H. untersuchten wir auch die Wirksamkeit der intranasalen Schutzimpfung gegen Pasteurellen beim Kalb. Zur intranasalen Applikation diente ein Sprayadapter. Die Impfung wurde entweder einmal (am Tag der Aufstallung) oder zweimal (am 1. und 10. Tag der Aufstallung) vorgenommen. Die Ergebnisse der klinischen Prüfung in einem Zeitraum von 4 Wochen nach der Impfung sind in Abbildung 2 dargestellt.

Insgesamt impften wir 72 Kälber zweimal und 18 Kälber einmal intranasal mit der polyvalenten Pasteurellen-Vaccine. Die Impfung wurde in allen Fällen reaktionslos vertragen. Die Impfgruppen verzeichneten auch weniger respiratorische Erkrankungen als die Kontrollgruppe. Im einzelnen lag bei der Kontrollgruppe die Morbiditätsrate bei 69 %, bei der einmal geimpften Gruppe bei 54 % und bei der zweimal geimpften Gruppe bei 39 %. Die Wirksamkeit der zweimal intranasal geimpften Gruppe war wesentlich besser als die der einmal geimpften Gruppe.

In einem anderen Kälbermastbetrieb (Bestand S.) immunisierten wir, aufgrund der Erfahrungen in Bestand H., die Kälber nur noch zweimal intranasal. Der Impfstoff war derselbe wie in Bestand H. In diesem Betrieb wurden von 76 neu aufgestellten Kälbern 38 am 3. und 10. Aufstallungstag intranasal geimpft und 38 nicht geimpft. Das klinische Bild bei den beiden Tiergruppen während der 3-monatigen Mastperiode ist in Abbildung 2 zusammengestellt. Von den 38 geimpften Kälbern erkrankten 9 (24 %) und von den 38 nicht geimpften Kälbern 12 (31,5 %) an respiratorischen Symptomen.

Abb. 1: Wirksamkeit der Pasteurellen-Schluckvaccine in einem Kälberaufzuchtbetrieb über einen Zeitraum von 12 Monaten.

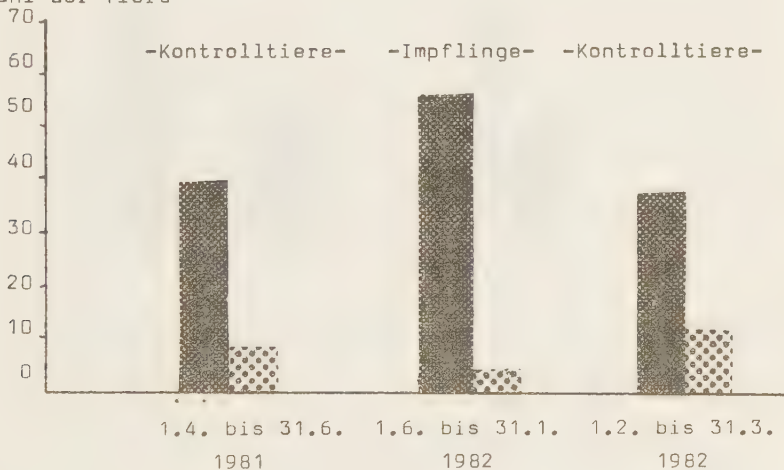


Tiere, o. B.



Tiere mit respiratorischen Symptomen

Zahl der Tiere



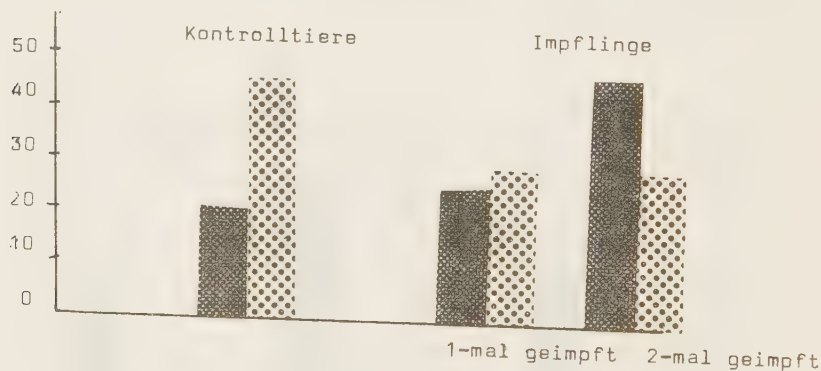
Untersuchungszeitraum

Abb. 2: Wirksamkeit der intranasalen Pasteurella-Impfung
in Kälbermastbetrieben.

- Tiere, o. B.
 ■ Tiere mit respiratorischen Erscheinungen

Bestand H.

Zahl der Tiere



Bestand S.

Zahl der Tiere



D. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Die vorliegenden Untersuchungen zur lokalen Immunisierung gegen Pasteurella waren zweigleisig angelegt. Zunächst wurden am Modell "P.multocida-Maus" die Grundlagen zur lokalen Immunisierung gegen Pasteurellen erarbeitet. Im zweiten Abschnitt konnte dann aufbauend auf die Ergebnisse bei der Maus, die lokale Immunisierung gegen Pasteurellen in der Praxis erprobt werden.

Bei der Wahl des Impfstoffes entschieden wir uns für einen Impfstoff auf der Basis hitzeinaktivierter Keime. In früheren Untersuchungen bei der Maus erwies sich dieser Impfstoff als gut wirksam (Chorherr, 18). Die Träger der Wirksamkeit sind in diesem Impfstoff Kapselantigene der Pasteurellen und nicht die somatischen Antigene, wie unsere Kreuzimmunisierungsversuche bewiesen haben. Da unter den Kapselantigenen keine oder nur eine relativ unvollständige Kreuzimmunität ausgebildet wird, haben wir in eine polyvalente Vaccine für das Rind alle 4 bisher bekannten Kapselantigene von P.multocida aufgenommen.

Ein Unsicherheitsfaktor bei der von uns entwickelten Pasteurella-Kombinationsvaccine stellte die P.haemolytica Komponente dar. Im Gegensatz zu P.multocida sind P.haemolytica-Keime nicht für kleine Versuchstiere pathogen. Es war deshalb nicht möglich die Immunogenität von P.haemolytica-Stämmen im Versuchstiermodell zu untersuchen. Auch ist bei P.haemolytica im Vergleich zu P.multocida wenig über die immunisierenden Antigene bekannt. In unserer Vaccine haben wir deshalb ohne Prüfung einen, von einem an Pneumonie erkrankten Rind isolierten P.haemolytica-Stamm aufgenommen.

Beim Wirksamkeitsvergleich der Applikationsarten subkutan, oral und intranasal schnitten die beiden lokalen Applikationsarten Überraschend gut ab. Die intranasale Impfung war der subkutanen in der Wirksamkeit fast ebenbürtig. Auch die orale Impfung blieb deutlich über dem

von Ose und Muenster geforderten Mindestschutzwert von 2,0. Wenn man berücksichtigt, daß in unseren Versuchen die postvaccinale systemische Immunität gemessen wurde, so ist das Ergebnis der lokalen Immunisierungsarten noch höher einzuschätzen. Da anzunehmen ist, daß durch die orale und nasale Impfung auch eine lokale Immunität stimuliert wird, und daß die lokale Immunität der Schleimhäute eine wichtige Rolle bei der Abwehr der hauptsächlich im Respirationstrakt des Rindes haftenden Pasteurella-Infektionen spielt, kann man unter natürlichen Bedingungen in der Praxis die gleiche, wenn nicht sogar eine bessere Wirkung der lokalen Immunisierung erwarten.

Ähnlich gute Ergebnisse wurden nach oraler Impfung gegen P.multocida-Infektionen des Geflügels und zwar vor allem mit Lebendimpfstoffen beschrieben (vgl. Schrifttum).

Entsprechende Erfahrungen bei anderen Tierarten, sowohl mit der oralen als auch mit der intranasalen Impfung fehlten bisher. Die gute Wirksamkeit unseres Impfstoffes aus hitzeinaktivierten Keimen bei der Maus mit P.multocida-Stämmen vom Rind rechtfertigt weitere Untersuchungen im Hinblick auf die Entwicklung eines polyvalenten, inaktivierten Pasteurella-Impfstoffes für das Rind. Bakterielle Lebend-Impfstoffe einzusetzen bedeutet immer ein Risiko bei der heute noch lückenhaften Kenntnis über das Verhalten von attenuierten Bakterienstämmen. Dies trifft besonders für Impfungen zu, bei denen wirksame Impfstoffe aus inaktivierten Keimen zur Verfügung stehen.

Neben der Stimulierung einer lokalen Schleimhautimmunität erwarteten wir uns von der lokalen Immunisierung auch einen Vorteil bezüglich der Unschädlichkeit, denn die Gefahr von postvaccinalen Komplikationen ist bei lokaler Impfung wesentlich geringer als nach parenteraler Impfung (Baljer, 3). Dieser Vorteil spielt vor allem bei P.multocida-Impfstoffen eine große Rolle, denn der Einsatz parenteraler P.multocida-Vaccinen scheiterte oft an dem relativ hohen Risiko von

Impfschäden. *P. multocida* enthält wie die meisten gramnegativen Bakterien Endotoxine oder zumindest endotoxin-ähnliche Substanzen. Aus diesem Grund ist nach Carter (1975) die parenterale Impfung mit *P. multocida* Vaccinen immer mit dem Risiko eines Endotoxinschocks verbunden (16). Batu beobachtete nach intramuskulärer Impfung von 80075 Rindern und Büffeln 121 anaphylaktische Reaktionen und 5 Todesfälle (4). Nach Engelbrecht ist eine erhöhte allgemeine Anfälligkeit nach der Grundimmunisierung und nach der Revaccination mit *Pasteurella* Impfstoffen bei Kälbern ein häufig zu beobachtendes Phänomen. (26).

In dem Feldversuch erwies sich unsere Kombinationsvaccine für das Kalb als absolut unschädlich, obwohl Antigene von 5 verschiedenen *Pasteurella*-Stämmen enthalten waren. Die Wirksamkeit der Vaccine war dagegen noch nicht hundertprozentig. Dies konnte man auch nicht erwarten, da bei den respiratorischen Erkrankungen des Kalbes neben Pasteurellen vor allem auch verschiedenen Virusarten beteiligt sind. Die lokale Applikation brachte aber eine Steigerung der Wirksamkeit im Vergleich zu Ergebnissen von Palotay et al. mit der subkutanen Impfung (45). Nach zweimaliger subkutaner Impfung beschrieben Palotay et al. in Kälbermastbetrieben bestenfalls eine Senkung der Morbiditätsrate um 10 %, während wir mit der lokalen Impfung zum Teil Senkungen bis zu 30 % erreichten. Die Ergebnisse der anderen bekannten Kombinationsvaccinen gegen die respiratorischen Erkrankungen beim Kalb lassen sich nicht direkt mit unseren Ergebnissen vergleichen, da diese Vaccinen neben den Pasteurellen- auch Virusantigene enthielten (Hamdy u. Trapp, Matsuoka et al., Mayr et al., Ungureanu et al., 29, 39, 40, 52). Aber auch mit diesen parenteral zu verabreichenden Kombinationsimpfstoffen wurde günstigenfalls nur eine Senkung der Erkrankungsrate aber keine völlige Ausrottung der Pneumopathien beschrieben.

Die in unseren Untersuchungen beobachteten unterschiedlichen Ergebnisse in einzelnen Betrieben lassen vermuten, daß die Zusammensetzung unserer *Pasteurella*-Kombinations-

vaccine noch nicht optimal ist. Ein Fragezeichen steht vor allem hinter der P.haemolytica-Komponente, denn hier wurde nur ein zufällig, von einem kranken Rind isolierter Feldstamm in die Vaccine aufgenommen. Es ist aber nicht auszuschließen, daß in der Praxis auch P.haemolytica-Stämme mit anderer Antigenstruktur eine Rolle spielen und, daß diese Stämme nicht durch die Vaccine abgedeckt wurden. Bisher gibt es bei P.haemolytica vergleichsweise wenig Erhöhungen über die Serotypenvielfalt bei Rinder-Stämmen. Durch zukünftige epidemiologische Untersuchungen über das Vorkommen von P.haemolytica-Stämmen beim Rind muß versucht werden, die von uns entwickelte Kombinationsvaccine gegen Pasteurellainfektionen beim Rind weiter zu verbessern.

E. Zusammenfassung

Im aktiven Mäuseschutzversuch und im Feldversuch beim Kalb wurde die Wirksamkeit der oralen und intranasalen Schutzimpfung gegen Pasteurellen untersucht. Zur Immunisierung dienten hitzeinaktivierte Keime der *P.multocida*-Serotypen 7:A, 6:B, 6:D und 6:E und eines *P.haemolytica*-Stammes. Die Antigene wurden entweder getrennt (Mäuseversuch) oder kombiniert (Feldversuch) verimpft.

Die *P.multocida*-Impfstoffe waren im Mäuseschutzversuch sowohl bei oraler als auch bei intranasaler Applikation wirksam. Nach mehrmaliger, oraler Impfung mit $2,5 \times 10^9$ inaktivierten Keimen lagen die Schutzwerte deutlich über dem von Ose und Muenster für Pasteurella-Impfstoffe geforderten Mindestschutzwert. Die orale und intranasale Impfung stimulierte deutliche, mit dem ELISA meßbare Antikörperanstiege bei Mäusen.

In Kälberaufzucht- und Kälbermastbetrieben senkte die zehnmalige, orale Impfung mit der Pasteurella-Kombinationsvaccine die Morbiditätsrate um 10 bis 20 Prozent. Die Ergebnisse mit der intranasalen Impfung waren in der Praxis sehr unterschiedlich. Nach zweimaliger intranasaler Impfung traten in einem Bestand 30 % und in einem anderen Bestand dagegen nur 7 % weniger respiratorische Erkrankungen auf.

Summary

The effectiveness of oral and intranasal vaccination against *Pasteurella* was studied using active mice protection test and field trials in calves. For immunisation heat-inactivated germs of *P.multocida* serotype 7:A, 6:B, 6:D, 6:E and of a *P.haemolytica* strain were used. The antigens were administered separately (experiments in mice) or in combination (field trials).

In mice protection test the *P.multocida*-vaccines were efficient as well after oral as after intranasal application. With all application methods the obtained protection rates were obviously higher than the required minimal protection rate (Ose and Muenster). The necessary vaccination dosages amounted to $1,25 \times 10^{11}$ for ten times oral and 3×10^9 for single intranasal vaccination. After oral and intranasal immunization a clear increase of antibodies could be measured with ELISA.

In calf-breeding- and calf-fattening farms the morbidity rate was reduced within 10 to 20 % after administering a polyvalent, oral *Pasteurella*-vaccine. The results with twice intranasal vaccination varied in the different forms. In herd H. respiratory diseases were reduced by 30 % and in herd S. by 7 %.

F. LITERATURVERZEICHNIS

1. Bain, R.V.S.: Immunization against bovine pasteurellosis
Bull. Off. Int. Epiz. 42, 256 (1954b)
2. Baldwin, D.E., R.G. Marshall, and G.E. Wessmann: Experimental
infektion in Calves with Myxovirus PI-3 and Pasteurella
haemolytica.
Am. J. vet. Res. 28, 1773-1782 (1967)
3. Baljer, G.: Untersuchungen über die Unschädlichkeit,
Wirksamkeit und Grenzen einer oralen Schutzimpfung
mit inaktivierten Bakterien bzw. Toxoiden gegen
bakterielle Krankheiten am Modell Escherichia coli,
Clostridium tetani und novyi und Pasteurella multocida.
Vet. Med. Habil. Schrift. München 1980
4. Batu, A.: Anaphylactic reactions in cattle as a result
of the vaccination campaign against haemorrhagic
septicaemia in 1964. Türk. vet. Hekim. Dern. Derg.
35, 463 (Zit. n. Vet. Bull. 36: 2088, 1966)
5. Bierer, B.W., and T.H. Eleazer: Continuous Use of a Live
Vaccine in the Drinking Water Against Fowl Cholera
Infection in Turkeys.
Poultry Science 47, 1656 (1968)
6. Bierer, B. W., and W.F. Scott: Comparison of Attenuated
Live Pasteurella multocida Vaccine Given in the
Drinking Water Every Two Weeks to an Injected
Oil-Base Bacterin Administered to Turkeys
Poultry Science 48, 520-523 (1969)
7. Bierer, B.W.: Comparison of a Live Drinking Water Vaccine
for Fowl Cholera in Turkeys to all Killed Drinking
Water Vaccine and to Five Injected Commercial Bacterins.
Received for publication Sept. 9, 1968
8. Bierer, B.W., and W.T. Derieux: Immunologic Response of
Turkeys to an Avirulent Pasteurella multocida Vaccine
in the Drinking Water.
Poultry Science 51, 408-416 (1972)
9. Bierer, B.W., and W.T. Derieux: Immunologic Response of
Turkeys to an Avirulent Pasteurella multocida Vaccine
in the Drinking Water.
2. Duration of Immunity
Poultry Science 51, 1402-1408 (1972)

10. Bierer, B.W., and W.T. Derieux: Efforts to Transmit and to Enhance the Virulence of an Avirulent Strain of *Pasteurella multocida* in Turkeys.
Poultry Science 52, 1510-1516 (1973)
11. Bierer, B.W., and W.T. Derieux: Exposing Turkeys by Various Routes to an Avirulent and Virulent Strains of *Pasteurella multocida*
Poultry Science 52, 2290-2298 (1973)
12. Bierer, B.W., and W.T. Derieux: Immunologic Response of Turkeys poults of Various Ages to an Avirulent *Pateurella multocida* Vaccine in the Drinking Water.
Poultry Science 54, 784-787 (1975)
13. Bierer, B.W. and W.T. Derieux: The Ability of Blood Plasma from Drinking Water Vaccinated Turkeys to Protect Against a Lethal Challenge of *Pasteurella multocida*.
Poultry Science 54, 2091-2093 (1975)
14. Bierer, B.W.: An Evaluation of the Effect of Various Concentrations of the Clemson University *Pasteurella multocida* Drinking Water Vaccine on the Immune Response Against Fowl Cholera Disease in Turkeys.
Poultry Science 56, 327-330 (1977)
15. Cameron, C.M. and Gertruida Smit: Immune response of rabbits mice and sheep to polyvalent *Pasteurella* vaccine.
Onderstepoort J. Vet. Res. 37: 217
16. Carter, G.R.: Studies on *Pasteurella multocida*.
A bacterin for the prevention of shipping fever in Canada
Vet. Med. 52: 254
17. Chengappa, M.M., G.R. Carter, and T.S. Chang: A Streptomycin-Dependent Live *Pasteurella multocida* Type-3 Vaccine for the Prevention of Fowl Cholera in Turkeys.
Avian Diseases Vol 23. No 1, Jan.-May. 1973
18. Chorherr S.: Untersuchungen über eine Wärmeinaktivierung von Pasteurellen unter Erhalt der Immunisierenden Eigenschaften
Dissertation 1974 aus dem Institut f. Mikrobiologie und Infektionskrankheiten der Tiere der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

19. Coates, S.R., M.M. Jensen, and E.D. Brown: The Response of Turkeys of Varying Dosis of Live Oral *Pasteurella multocida* Vaccine.
Poultry Science 56 1, 273-276 (1977)
20. Derieux, W.T.: Effect of Furazolidon in Feed on Immune Response of Turkeys Vaccinated with Live *Pasteurella multocida* in Drinking Water.
Avian Diseases 20 (3) 552-555 (1976)
21. Derieux, W.T.: Immune Response of Medicated Turkeys Vaccinated with Live *Pasteurella multocida*.
Am. J. vet. Res. 38 (4) 487-9 (1977)
22. Derieux, W.T.: Response of Young Chickens and Turkeys to Virulent and Avirulent *Pasteurella multocida* Administered by Various Routes
Avian Diseases Vol 22 No 1 Jan.-M. (1978)
23. Derieux, W.T.: Effect of Various Feed Additives of Immune Response of Turkeys Vaccinated with Live *Pasteurella multocida* in Drinking Water.
Avian Diseases vol 24 (2) (1979)
24. Dua, S.K., and S.K. Maheswara: Studies on *Pasteurella multocida* VII. Dynamics and Temporal Development of Local Humoral Immunity Induced By A Live Avirulent Fowl Cholera Vaccine.
Avian Diseases 22.4, 771-777 (1978)
25. Dziuk, H.E., G.H. Nelson, G.E. Duke, S.K. Maheswara, and M.S. Chi: Acquired Resistance in Turkey Boulds to *Pasteurella multocida* (P-1059 strain) during Aflatoxin Consumption.
Poultry Science 57 (5) 1251-1254 (1970)
26. Engelbracht, H.: Present status of immunization procedures for pasteurellosis,
J.A.V.M.A. 152: 881
27. Colubnichii, V.P., and Shusterman, R.D.: Simultaneous Immunization of Fowls Against Pasteurellosis and Newcastle Disease Laboratory and Field Trials.
Trudy. Belorusskii Nauchno.
Issledovated skii Veterinarnyi Inst. 13
74-78 (1975)

28. Green, T.M.: Patterns of Bacterial Clearance in Murine Influenza. In Antimicrobial Agents and Chemotherapy Am. Society of Microbiology (1965)
29. Handy, A.H. and A.L. Trapp: Immunization of cattle against shipping fever: experimental exposure. Am.J.Vet.Res.25 : 1648
30. Heddleston, K.L., and P.A. Rebers: Fowl cholera: Cross-Immunity Induced in Turkeys with Formalin-Killed Invivo-Propagated Pasteurella multocida. Avian Diseases 16 (3) (1972)
31. Heddleston, K.L., and P.A. Rebers: Fowl cholera: Active Immunity Induced in Chickens and Turkeys by Oral Adminstration of Killed P.multocida. Avian Diseases 12, 129-134 (1968)
32. Heddleston, K.L., P.A. Rebers, Geraldin, and G.E. Wessmann: Fowl cholera: Immunologic and Serologic Response in Turkeys to Live Pasteurella multocida Vaccine Adminstered in the Drinking Water. Poultry Science 54, 217-221 (1975)
33. Hertmann, I., J. Markenson, A. Michael, and E. Geier: Attenuated Live Fowl Cholera Vaccine.
1. Development of Vaccine Strain M-3-G of Pasteurella multocida.
Avian Diseases. In press (1979)
34. Jakob, G.J., and G.M. Green: Immune Enhancement of Bacterial Activity in Mice Virus Pneumonia. J. clin. Invest. 52, 2878-2884 (1973)
35. Jones, Y.E., Derieux, W.T., J.W. Dick, and B.L. Hughes: The Effect of Vacciting Turkeys with the CU Strain of Pasteurella multocida on Subsequent Reproduction Performance and Longivity of Immunity. Poultry Science 56 (6), 2013-2015 (1977)
36. Jones, F.S.: The production of Antibodies in Rabbits by Simplified Intratracheal Method. Jan . expr. med. 37, 789 (1923)

37. Lopez, A, R.G. Thomson, and M. Savan: The Pulmonary Clearance of *Pasteurella hemolytica* in Calves Infected with Bovine Parainfluenza 3 Virus
Can J. Com. Med. 40, 4 (1976)
38. Maheswaran, S.K., McDowell, J.R. and B.S. Pomeroy: Studies on *Pasteurella multocida*. I. Efficacy of an avirulent mutant as a live vaccine in Turkeys.
Avian Diseases 17 (2), 396-405 (1973)
39. Matsuoka, T., C. Gale, and R.M. Berkmann: Calfhood immunization against an experimental Parainfluenza and *Pasteurella* Challenge
Canad. J. Comp. Med. Vet. Sci, 30 228-232 (1966)
40. Mayr, A., G. Witzigmann, H. Schels und P. Plank: Entwicklung und Erprobung eines Kombinationsimpfstoffes gegen die Parainfluenza-3-, Mucosal-Disease- und *Pasteurella hämolytica*-Infektion des Rindes.
Zbl. Vet. Med. 16, 454-479 (1969)
41. Michael, A., Geier, E., R. Konsntok, I, Hertmann, J. Markenson: Attenuated Live Fowl Cholera Vaccine II,
Avian Diseases 21 B (4), 870-885 (1979)
Some Biological Properties of Strain M-3-G
42. Michael, W., E. Geier, R. Konsntok, I. Hertmann, and J. Markenson: Attenuated Live Fowl Cholera Vaccine III, Laboratory and Field Vaccination Trials in Turkeys and Chickens
Avian Diseases vol.24 no 4, 878-885
43. Geschger, M.O., and M.K.B. Berlym: A Simple Procedure for Localized Mutagenesis Using Nitrosoguanidine
Molec. Gen. Genet. 134, 77-83 (1974)
44. Ose, E.E. and B.S. Muenster: A method for evaluation of vaccines containing *Pasteurella multocida*.
Am.J.Vet.Res. 29, 1863 (1968)
45. Palotay, I.L., Young, Stuart, S.A. Lovelace and I.H. Newhall: Bovine respiratory infections. II. Field trial using bacterial vaccine products as a means of prophylaxis.
Am.J.Vet. Res.24: 1137 (1963)

46. Rice, J.T., Dick J.W., and B.W. Bierer: Subcutaneous Vaccination of Chickens with a Live, Avirulent *Pasteurella multocida* Vaccine.
Poultry Science 57 (6), 1514-1518 (1978)
47. Rice, J.T.: The Use of the Clemson University Strain *Pasteurella multocida* as a Live Vaccine Against Fowl Cholera in Chickens.
Dissertation Clemson University (1977)
48. Rice, J.T., B.W. Bierer, and J.W. Dick: Vaccination of Chickens through the Drinking Water with a Live *Pasteurella multocida* Vaccine.
Poultry Science 58, 18-22 (1979)
49. Terry, R.J.: Commercial Use of the Oral Live Cholera Vaccine.
Proceedings of 26th Western Poultry Diseases Conference and 11th Poultry Health Symposium 5-9 (1977)
50. Tsimokh, P.F.: Aerosol Immunisation of Poultry against *Pasteurella*.
Veterinariii. (10), 56-58 (1976)
51. Tsimokh, P.F.: Vaccination on Ducklings Against *Pasteurella* and Viral Hepatitis
Veterinariii. (11), 37-38 (1979)
52. Ungureanu, C., V. Minciuna, A. Jordache und U. Fierlinger: Immunprophylaktische Methoden zur Vorbeugung der Pneumopathien bei Jungrindern.
Arch. exp. Vet. Med. 35, 437-441 (1981)
53. Weiß, B.D., and R.G. Carter: Live streptomycin-dependent *Pasteurella multocida* vaccine for the prevention of hemorrhagic septicemia
Am.J.vet. res. 39 (9) 1534-1537 (1978)
54. Wilkie, B.N., and A.M. Norris: The Effect of Route of Immunisation on the Lapine Immune Response to Killed *Pasteurella haemolytica* and the Influence of Aerosol Challenge with the Live Organism.
Canad. J. Comp. Med. 40 (4), 346 (1976)

Herrn Professor Dr. DDr. h.c. A. Mayr möchte ich
an dieser Stelle für die Überlassung des Themas
und für die wertvollen Hinweise danken.

Ferner danke ich Herrn Priv. Doz. Dr. Dr. habil.
G. Baljer für die hilfreiche Unterstützung.

Lebenslauf

Ich, Edgar Waldner, wurde am 13. Dez. 1953 als zweites von 5 Kindern des Dr. med. vet. H. Waldner, praktischer Tierarzt in Teisendorf, und seiner Frau Elisabeth Waldner, geb. Stockklausner, in Teisendorf geboren.

September 1960: Eintritt in die Volksschule in Teisendorf

September 1964: Wechsel an das Chiemgau-Gymnasium in Traunstein

Juni 1973: Neusprachliches Abitur am Chiemgau-Gymnasium in Traunstein

September 1973 - März 1974: Halbjahreskurs an der Hotelfachschule in Bad Reichenhall

März 1974 - April 1975: Studium der allgemeinen Agrarwissenschaften in Bonn

April 1975 - April 1977: Studium der allgemeinen Agrarwissenschaften in Weihenstephan

April 1977 - Juni 1981: Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians Universität in München

Juli 1981 - März 1982: vollbeschäftigte, wissenschaftliche Hilfskraft an der Chirurgischen Tierklinik der Universität München

